

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-015314
(43)Date of publication of application : 26.01.1993

(51)Int.Cl. A23J 3/34
C12P 21/06
// A23J 3/16

(21)Application number : 03-164678 (71)Applicant : FUJI OIL CO LTD
(22)Date of filing : 04.07.1991 (72)Inventor : ARAKI HIDEO
OUCHI YUKO
UESUGI SHIGEMI
HASHIMOTO YUKIO
SHIMODA TADAHISA

(54) METHOD FOR REMOVING BITTERNESS OF PEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To readily remove bitterness of peptides such as proline or aromatic amines by reacting a protein derived from an animal or a plant with a specific protease formulation.

CONSTITUTION: A protein derived from an animal or a plant is reacted with a protease formulation containing a prolyl endopeptidase or carboxypeptidase at 20–60° C (preferably 50° C) and pH4–7 (preferably pH5) for 4–5hr to carry out the objective removal of bitterness. Furthermore, the prolyl endopeptidase has the following physico-chemical properties. Relative activity of 0 for prolyl-p- nitroanilide when the carboxyl sides of proline in the peptide and protein are hydrolyzed and the hydrolytic properties for CBZ-Gly-Pro-pNa (CBZ is carbobenzoxy; pNa is p-nitroanilide) is 100, 0.29mM value of the substrate specificity (K_m) for the CBZ-Gly-Pro-pNa, optimum pH; about 5, optimum temperature; 37° C, pH stability of ≥85% residual activity at pH4–7 when treated at 37° C for 2hr, etc.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-15314

(43)公開日 平成5年(1993)1月26日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 J 3/34		7236-4B		
C 1 2 P 21/06		8214-4B		
// A 2 3 J 3/16		7236-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 2(全 4 頁)

(21)出願番号	特願平3-164678	(71)出願人	000236768 不二製油株式会社 大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5 号
(22)出願日	平成3年(1991)7月4日	(72)発明者	荒木 秀雄 茨城県北相馬郡守谷町松前台4-2-3 B-301
		(72)発明者	大内 祐子 千葉県柏市明原3-9-8
		(72)発明者	上杉 滋美 茨城県北相馬郡守谷町松前台4-2-3 A-201
		(74)代理人	弁理士 青木 朗 (外3名) 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ベブチドの苦味除去方法

(57)【要約】

【目的】 プロリルエンドペプチダーゼ及びカルボキシペプチダーゼを含む酵素製剤でプロリンや、芳香族アミノ酸、分枝鎖アミノ酸を除去することによるベブチドの苦味除去

【構成】 ベブチド中のプロリンを、プロリルエンドペプチダーゼでカルボキシル側で加水分解し、ベブチドのカルボキシル末端にきたプロリンや、その他の芳香族アミノ酸、分枝鎖アミノ酸をカルボキシペプチダーゼにより遊離させることにより、ベブチドの苦味を除去する。

【効果】 プロリルエンドペプチダーゼ及びカルボキシペプチダーゼ活性を含有するプロテアーゼ製剤を使用することにより、簡単に苦味の少ないベブチドを作成することができる。

〔特許請求の範囲〕

〔請求項1〕 動植物由來の蛋白質に、プロリルエンドペプチダーゼ及びカルボキシペプチダーゼを含有するプロテアーゼ製剤を作用させることによる、苦味の少ないペプチドを製造する方法。

〔請求項2〕 プロリルエンドペプチダーゼが以下の理化学的性質：

(イ) 作用：ペプチド及び蛋白の中に存在するプロリンのカルボキシル側を加水分解する。

(ロ) 基質特異性：

(1) CBZ-Gly-Pro-pNA (CBZ : カルボベンゾキシ、pNA : p-ニトロアニリド) に対する加水分解活性を 100 とした場合の、プロリルバラニトロアニリドに対する相対活性は 0 である。

(2) CBZ-Gly-Pro-pNA に対する K_m 値は 0.29 mM である。

(ハ) 至適 pH : 5 付近

(ニ) 至適温度 : 37 °C

(ホ) pH 安定性 : 37 °C で 2 時間処理した場合、pH 4 ~ 7 において 85% 以上の残存活性を示す。

(ヘ) 温度安定性 : pH 5 において 52 °C、1 時間処理で 80% 以上活性が残存。

を有する、請求項1記載の方法。

〔発明の詳細な説明〕

〔0001〕

〔産業上の利用分野〕 本発明は、ペプチドの苦味の除去方法に関し、詳細には、ペプチドに存在するプロリンのカルボキシル末端をプロリルエンドペプチダーゼにより切断後、カルボキシルペプチダーゼによりペプチドのカルボキシル末端にきたプロリンや芳香族アミノ酸、分枝鎖アミノ酸を遊離することによるペプチドの苦味の低減方法に関する。

〔0002〕 ペプチドの製造においては現在各種の市販されているプロテアーゼが使用されている。しかし、これらのプロテアーゼはプロリンの前後を切る能力が弱い。そのため、ペプチドの中にプロリンが残ることになるが、これらプロリンを含んだペプチドは苦味の原因になり、ペプチドの製造において問題となっている。また、ペプチドのカルボキシル末端に存在する芳香族アミノ酸及び分枝鎖アミノ酸もペプチドの苦味の原因であることが報告されている。

〔0003〕 苦味の除去については、はじめのペプチドの生産において、使用するプロテアーゼの組合せを変えることにより苦味の発生を抑えたり、苦味の発生したペプチドに対して各種のエキソプロテアーゼを作用させることにより苦味の低減がおこなわれている。しかしこれらの方法による苦味の低減には限界がある。また、カルボキシペプチダーゼを使用することによるペプチド中のプロリンや芳香族アミノ酸、分枝鎖アミノ酸を遊離しようとする試みもなされているが、カルボキシペプチダーゼのみを使用する方法では遊離するアミノ酸の量が多く、これらの遊離したアミノ酸がペプチドの味に悪影響を与える。

2

ゼのみを使用する方法では遊離するアミノ酸の量が多く、これらの遊離したアミノ酸がペプチドの味に悪影響を与える。

〔0004〕

〔発明が解決しようとする課題〕 本発明はペプチドの苦味の低減に際し、上述のように従来の方法では限界があることに鑑み、プロリルエンドペプチダーゼ及びカルボキシペプチダーゼを含むプロテアーゼ製剤を使用することにより苦味の少ないペプチドの生産方法を提供しようとするものである。

〔0005〕

〔課題を解決するための手段〕 本発明によれば、動植物由來の蛋白質に、プロリルエンドペプチダーゼ及びカルボキシペプチダーゼを含有するプロテアーゼ製剤を使用させることによる、苦味の少ないペプチドを製造する方法が提供され、ここでプロリルエンドペプチダーゼは以下の理化学的性質：

(イ) 作用：ペプチド及び蛋白の中に存在するプロリンのカルボキシル側を加水分解する。

(ロ) 基質特異性：

(1) CBZ-Gly-Pro-pNA (CBZ : カルボベンゾキシ、-pNA : p-ニトロアニリド) に対する加水分解活性を 100 とした場合の、プロリルバラニトロアニリドに対する相対活性は 0 である。

(2) CBZ-Gly-Pro-pNA に対する K_m 値は 0.29 mM である。

(ハ) 至適 pH : 5 付近

(ニ) 至適温度 : 37 °C

(ホ) pH 安定性 : 37 °C で 2 時間処理した場合、pH 4 ~ 7 において 85% 以上の残存活性を示す。

(ヘ) 温度安定性 : pH 5 において 52 °C、1 時間処理で 80% 以上活性が残存。

を有する。

〔0006〕 本発明者らは動植物のタンパク質に由来する各種ペプチドの苦味を低減する方法について検討を行った。その結果、ペプチドの苦味の主な原因はプロリンに由来するペプチドの折れ曲がった構造と、ペプチドのカルボキシル末端に存在する分枝鎖アミノ酸、芳香族アミノ酸によるものであるという情報を得、ペプチド中に存在するプロリンのカルボキシル側を酵素的に切断することによりペプチドの折れ曲がった構造を除き、それによりペプチドのカルボキシル末端にくるプロリンと、元々ペプチドのカルボキシル末端に存在する分枝鎖アミノ酸、芳香族アミノ酸をカルボキシペプチダーゼにより遊離させることにより苦味の低減が可能であるという推論に達した。しかし、従来使われているプロテアーゼはプロリンの前後のペプチド結合を切断する能力がほとんどなく、またカルボキシペプチダーゼ活性もないため、新たにプロリルエンドペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、プロテアーゼをガビに同時に生産させ、これによ

り得られた酵素製剤を使用することにより苦味の少ないペプチドを生産する方法を見いだし本発明を完成させることにいたった。

【0007】本発明において用いられる酵素製剤は、アスペルギルス オリーゼ (*Aspergillus oryzae*) FS 1-32 (微研菌寄第12193号) に由来する、プロリルエンドペプチダーゼ及びカルボキシペプチダーゼを含有するプロテアーゼ製剤である。

【0008】動植物由來の蛋白質としては、大豆蛋白、小麦蛋白、カゼイン等が用いられる。

【0009】本発明を実施するにあたっての反応条件は以下のとおりである。

反応温度： 20～60°C (好ましくは50°C)

pH： 4～7 (好ましくは5)

反応時間： 使用する基質、反応温度、pH、酵素量により異なるが、4～5時間程度である。

酵素濃度： 基質1gあたり

プロテアーゼ 650 PU程度

カルボキシペプチダーゼ 0.01 U程度

プロリルエンドペプチダーゼ 0.03 mU程度

酵素濃度をこれ以上に増やすことにより反応時間を短縮することが可能である。また、反応時間を長くするかわりに酵素添加量を減らすこともでき、これにより酵素にかかるコストを低減することも可能である。

【0010】本発明の方法において用いられる酵素活性は以下の方法により求められる。

プロリルエンドペプチダーゼの活性

基質であるペプチドに作用してプロリンのカルボキシル側の加水分解反応を定量することにより求める。この明細書に記載した酵素活性は、CBZ-Gly-Pro-pNAを基質として用いる下記の方法により測定されたものであって、1分間に1μモルのパラニトロアニリドを遊離する酵素活性を1ユニット(U)としている。CBZ-Gly-Pro-pNA分解活性測定法：40%ジオキサン溶液に2mMのCBZ-Gly-Pro-pNAを溶解したもの0.25mlに0.1Mクエン酸-リノ酸2ナトリウム緩衝液(pH 5.0)1mlを加えたものを基質とする。これを37°C10分間予熱後酵素溶液を0.1ml添加し、37°Cで2時間反応させる。反応後10%のTriton-X100を含む1M塩化カリウム-塩酸緩衝液(pH 2)（停止液）で反応を停止し、停止液と酵素溶液を加える順序を逆にしたものを作成した。その結果、以下のようにプロリルエンドペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ活性を有しないプロテアーゼによって作成したペプチドに比べ、苦味が少ないことが認められた。

(CBZ：カルボベンゾキシ)

【0011】カルボキシペプチダーゼの活性測定

バネラー10人中

* 基質であるペプチドのカルボキシル側の加水分解反応を定量することにより求める。この明細書に記載した酵素活性は、CBZ-Glu-Tyrを基質として用いる下記の方法により測定されたものであって、1分間に1μモルのチロシンを遊離する酵素活性を1ユニット(U)としている。CBZ-Glu-Tyr分解活性測定法：0.5mM CBZ-Glu-Tyr/0.05Mリン酸緩衝液(pH 7)1mlを基質とする。これを37°C20分間予熱後酵素溶液を50μl添加し37°Cで60分反応させる。反応後ニンヒドリン試薬500μlを加え、沸騰湯浴上で15分間加熱後冷水で冷却し、0.1Mリン酸二ナトリウム/アセトン5mlを添加し、酵素溶液の代わりに水を添加したものを対象液として570nmにおける吸光度を測定する。これをあらかじめ作成しておいた標準曲線に当てはめ、遊離したチロシンの量よりカルボキシペプチダーゼの活性を求める。

【0012】プロテアーゼの活性測定

基質であるタンパク質に作用して遊離してくるアミノ酸を定量することにより求める。この明細書に記載した酵素活性は、カゼインを基質として用いる下記の方法により測定されたものであって、1分間に1μモルのチロシン当量のアミノ酸を遊離する酵素活性を1ユニット(PU)としている。カゼイン分解活性測定法：1%カゼイン/0.05Mリン酸緩衝液(pH 7)5mlを基質とする。これを37°C10分間予熱後酵素溶液を1ml添加し、37°Cで10分間反応させる。0.44Mトリクロロ酢酸溶液5mlを添加し反応を止め、37°C20分間放置後濾紙にて濾過する。濾液1mlに0.4M炭酸ナトリウム溶液5ml、フォリン試薬1mlを添加し37°C20分放置後660nmで吸光度を測定する。これをあらかじめ作成しておいた標準曲線に当てはめカゼイン分解活性を求める。

【0013】

【実施例】

例1

大豆蛋白30gを含む溶液300mlに、プロリルエンドペプチダーゼ4.8mU/g、カルボキシペプチダーゼ2.1U/g、プロテアーゼ124000PU/gを含有する酵素製剤0.166gを添加し、50°Cで5時間反応させペプチドを作成した。その結果、以下のようにプロリルエンドペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ活性を有しないプロテアーゼによって作成したペプチドに比べ、苦味が少ないことが認められた。

通常のプロテアーゼに プロリルエンドペプチダーゼ
より作成したペプチド、カルボキシペプチダーゼを
含むプロテアーゼにより作成
したペプチド

苦味を感じた人数

10人

3人

5

苦味を感じなかった人数

【0014】例2

大豆蛋白に市販プロテアーゼ（プロチンAY：大和化成製）を作用させて作成されたペプチド30gを含む溶液300mlに対し、*Aspergillus oryzae* FS1-32（微工研菌寄第12193号）に由来するプロリルエンドペプチ*

バナーラー10人中

苦味を感じた人数

苦味を感じなかった人数

0人

7人

* ダーゼ4.8mU/g、カルボキシペプチダーゼ2.1U/gを含有する酵素製剤を0.116g添加し、50℃で5時間加温後官能検査を行った。その結果、本酵素による処理を行わないものに比べ酵素処理を行ったものは以下のように苦味の低減が認められた。

6

無処理ペプチド 酵素処理ペプチド

10人

2人

0人

8人

※作用させることにより、苦味の低減が可能である。このような苦味の少ないペプチドを各種の食品に添加することにより、その食品の持つ本来の味を損なうことなく食品のタンパク質を強化することができる。

【0015】

【発明の効果】本発明を利用することにより、苦味の少ないペプチドを容易に作成することができる。また、苦味の発生したペプチドに対してもプロリルエンドペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼを含有する酵素製剤を*

フロントページの続き

(72)発明者 橋本 征雄

千葉県柏市松ヶ崎字井戸作396-4 ワコ
ーレエレガанс104

(72)発明者 下田 忠久

茨城県筑波郡谷和原村緑の台5-7-1